Заболевания ушей и кожных покровов с порахсением грибками M. pachydermatis у собак и кошек из года в год в ветеринарной медицине остаются весьма актуальной проблемой [Ross Bona - 1997; Leena Saijonmaa-Kouluminies - 2002].

Целью наших исследований было определить количество отомикозов, вызванных M. pachydermatis, среди отитов различной этологии.

Материалы и методы, результаты исследований:

Установлено, что с января 2005 года в диагностической лаборатории ГУ «Санкт-Петербургская городская станция по борьбе с болезнями животных» при обследовании 47 домашних животных (36 — собаки, 11 - кошки) с общей симптоматикой поражения наружного слухового прохода основными клиническим проявлением было поражение наружного или среднего уха и значительно реже (2 случая) - воспаление внутреннего уха.

Проводили цитологические исследования сухих соскобов и мазков-отпечатков. Из слухового прохода патологический материал отбирался одноразовыми щеточками системы cyto-brash. Материал наносили согласно существующей методики на стекло, окрашивание проводили по методике Май-Грюнвальда, с доокрашиванием по Романовскому-Гимза. Подсохшие на воздухе мазки-отпечатки выдерживали 2 мин в растворе-фиксаторе красителя «Диахим-ГемиСтейн-М-Г». Далее, не сливая краски, добавляли 1 мл дистиллированной воды pH 6,8. Через 60 сек, краску с мазка сливали, и, не ополаскивая мазок, заливали рабочий раствор красителя «Диахим-ГемиСтейн-Р» на 10 минут. Окрашенные препараты промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Окрашенные препараты исследовались с помощью аппаратнопрограммного комплекса визуализации морфологических препаратов анализа и регистрации оптических и морфологических показателей «Видно ТесТ», в который входит микроскоп для наблюдения Axiostar plus - с использованием окуляра 10x20, иммерсионного объектива ЮОх/1,25 Oi1.

В клинической практике цитологические исследования позволяют быстро и адекватно оценить наличие популяций M. pachydermatis даже в небольшом количестве исследуемого материала, т.к. дрожжевой грибок обладает характерной морфологической структурой: форма «матрешки» или «земляного ореха».

По мнению зарубежных авторов (Chalmers Stephanie A., Medlean Linda) количество клеток M. pachydermatis считается повышенным при выделении при цитологическом обследовании более 10 клеток грибка в 15 полях зрения.

Наши исследования доказали, что количество клеток M. pachydermatis может достигать от 3 до 10 и более в одном поле зрения.

Поскольку проведенные исследования дали положительный результат на наличие M. pachydermatis у 95% собак и 87% кошек можно сделать заключение, что цитологические исследования отделяемого из наружного и среднего уха у животных являются весьма информативными, позволяют экономить время при постановке диагноза, имеют выраженное прикладное значение и рекомендуются к использованию в практической ветеринарии.

А.А. Белопольский, В.И. Кузнецов,
А.А. Белопольский (мл.), В.П. Авдошин, Т.И. Мансур
(Российский университет дружбы народов, г. Москва)

ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ЛИПОСОМ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТАФИЛОКОККОВОМ СЕПСИСЕ

Совершенствование способов регуляний невосприимчивости сельскохозяйственных и домашних животных к инфекционным заболеваниям имеет большое социально-экономическое значение. В последние годы внимание исследователей обращено на возможность использования в лечебно-профилактических целях липосом

Таблица 1

Выбор дозы золотистого стафилококка для моделирования острой микробной инфекции мышей

Доза микроба (млрд/мл)	Число мышей	Количество погибших животных в динамике опыта (10 суток)								% летальности
		1	2	3	6	7	8	9	10	
0,5	10	0	1	0	0	0	1	0	0	20
1.0	9	1	0	0	1	1	0	0	0	33
2,0	**10**	**4**	**0**	**0**	**3**	**1**	**0**	**1**	**0**	**90**
4,0	10	4	1	2	2	0	0	0	0	90
8,0	11	3 -	2	2	3	0	0	0	0	91

как носителей полифункциональных антигенов (4). Разработаны относительно простые и доступные методики получения стабильных липосом из смеси яичного лецитина, холестерина и фосфатидиловой кислоты в соотношении 9:5:1. Особенностью липосом является их полная биосовместимость с организмом млекопитающих и легкая утилизация без побочных реакций. Являясь «контейнером» для широкого ряда биологических и химических соединений (2), липосомы могут быть использованы и для иммунизации в виде иммунолипосом. Установлено, что комплекс, состоящий из липосом, содержащих антиген, способен вызывать более сильный иммунный ответ, чем просто иммунизация антигеном (1).

В литературе имеются положительные результаты использования иммунолипосом в инфекционной патологии при гриппе (1), туберкулезе (2), бруцеллезе (5), пневмонии (9), амебной дизентерии (7), гельминтозах (8), малярии (10), цистицеркозе (6) и др. Установлено, что депонирование токсинов в липосомах потенциально снижает токсическое действие транспортируемого вещества, например стрептомицина и амфотерицина-В (3).

Иммунное проявление действия липосом определяется способом их комплектации. Установлено, что иммуногенные свойства бычьего сывороточного альбумина проявлялись значительнее, если антиген одновременно находился на поверхности липосом и внутри них. В то же время характер связывания столбнячного анатоксина с липосомами не оказывает влияния на степень гуморального иммунитета.

Предположительно, иммунный ответ должен усиливаться при включении в состав липосом иммуномодуляторов. Одним из наиболее эффективных отечественных иммуномодуляторов является хемотаксический пептид (ХП) по химическому строению являющийся N-f-мет-лей-фен-гли. Включение в состав липосом наряду с бычьим сывороточным альбумином ХП усиливало антителообразование в 3-7 раз (4).

Учитывая значительную этиологическую роль золотистого стафилококка в развитии гнойно-септических заболеваний и осложнений и сравнительно низкую эффективность лечения стафилококковой инфекции иммунологическими методами, включая вакцинацию, нам представляется, что использование возможности создания полифункциональных иммуногенов на основе липосом, токсинов стафилококка и ХП, могло бы способствовать совершенствованию лечебно-профилактических мер при снижении риска возникновения и развития условно-патогенных инфекций. Отсутствие исследований по экспериментальному применению липосом, сконструированных одновременно с ХП и продуктами жизнедеятельности золотистого стафилококка, явилось целью наших исследований в данной области:

Липосомы готовили из смеси лецитин - холестерин в соотношении 2:1 на физиологическом растворе с использованием метода «обращенных фаз» из эфирного раствора.

В качестве протективного антигена использовали коммерческий препарат стафилококкового анатоксина (СА). ХП полученного в НИИ «Белок», г. Пущино, Россия. Иммуномодулятор вводили в состав липосом или исследовали его биологические свойства отдельно в концентрации от 1 до 100 мкг с целью проверки влияния ХП на формирование противостафилококкового иммунитета.

Экспериментальная модель перитонита у мышей получена с помощью возбудителей инфекции от хирургических больных с гнойными ранами. За сутки до за-

Таблица 2.

Зависимость протективного эффекта ХП и СА от их концентрации и связывания с липосомальным носителем
(введение препаратов за сутки до инфицирования стафилококком).

Препарат	Число павших животных за 10 суток наблюдения								% выживания
	1с	2с	3с	6с	7с	8с	9с	Юс	
ХП (1 мкг)	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**100**
ХП(Юмкг)	1	0	0	0	0	0	0	0	90
ХП (100 мкг)	0	1	0	2	0	0	0	0	70
ХП (1 мкг) в липосомах	0	2	1	1	0	0	0	0	60
ХП (10 мкг) в липосомах	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**100**
СА (0,0014 ЕС)	1	1	0	0	0	0	0	0	80
СА в липосомах	2	1	0	1	0	0	0	0	60
СА + ХП (10 мкг) в липосомах	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**100**
Контроль (физ. раствор)	3	0	2	1	1	0	0	0	30

ражения животных производили пересев микроорганизма на чашках Петри с мясопептонным агаром. Свежую культуру стафилококка смывали с поверхности агара стерильным физиологическим раствором и по стандартам мутности фотоэлектроколориметрически готовили суспензию живой культуры от 1 до 10 млрд микробных тел в 1 мл физ. раствора. Заражение мышей линии СВА массой 18-20 г производили внутрибрюшинным (в/б) введением стафилококка в объеме 1,0 мл. В зависимости от целей эксперимента определяли LD_{50} или LD_{100} в первые 3 суток после заражения. Верификацию стафилококкового сепсиса осуществляли путем определения инфицирования паренхиматозных органов, выделенных от павших или выживших и убитых животных методом мерного высева на селективной питательной среде.

В эксперименте на 50 мышах-самцах линии СВА исследовали динамику гибели инфицированных животных в зависимости от дозовой нагрузки выбранного возбудителя в диапазоне концентраций микробных тел от 0,5 до 8,0 млрд/мл. Полученные данные представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, увеличение дозовой микробной нагрузки с 0,5 до 8,0 млрд микробных тел после в/б заражения сопровождалось возрастанием летальности с 20% до 91 %. При достижении концентрации стафилококка 4,0 и 8,0 млрд/мл, убыль экспериментальных животных происходит более стремительно и в основном в ранние сроки, тогда как при заражении дозой 2,0 млрд летальность была практически такой же высокой, хотя смертность развивалась в течение всего периода наблюдений. Можно полагать, что при дозовой нагрузке 2,0 млрд стафилококков в 1 мл физ. раствора формируется управляемая модель постепенно нарастающей по своей тяжести стафилококковой инфекции, приближенной к клиническим формам данной микробной патологии. Более значительная степень заражения проявляется быстро развивающейся интоксикацией, которую трудно купировать испытуемыми средствами.

Поскольку ранее влияние ХП, СА и содержащих их липосом на течение экспериментальной стафилококковой инфекции не изучалось, представляло интерес выяснить: при каких условиях их применение (доза, время введения по отношению к стадии сепсиса: профилактически или с целью лечения, повторность приема данного иммуномодулятора и антигена, использование их в составе липосом и др.) возможен выраженный протективный эффект.

Для решения данных вопросов был поставлен эксперимент на 90 мышах линии СВА, которым за сутки до моделирования сепсиса (3 млрд живой суточной культуры стафилококка в 1,0 мл, в/б) также в/б в объеме 1,0 мл вводили в различной концентрации ХП, СА в свободном состоянии и в составе липосом (таблица 2).

Было установлено, что ХП уже в минимальной дозе 1 мкг на животное, введен-

ный профилактически за сутки до стафилококковой инвазии, был способен максимально (на 100%) защищать мышей от гибели, в то время как в контрольной группе (введение 1,0 мл физ. раствора за сутки до заражения) в течение 10 суток развития инфекционного процесса выживало лишь 30% мышей. Интересно отметить, что повышение концентрации ХП до 10 мкг/животное и 100 мкг/животное не способствовало максимальному проявлению протективных свойств данного препарата: наоборот, в группе животных, получивших 10 мкг ХП выжило 90% особей, а в группе мышей, получивших 100 мкг ХП - лишь 70%. Данный факт подтверждает ранее наметившуюся закономерность проявления защитных (лечебных, протективных, адаптационных, корригирующих и т.д.) свойств минимально значимой химической величины, которая является приемлемой для организма, вписывается в динамические энергетические и биохимические процессы.

Можно отметить и такой немаловажный факт, как снижение эффективности ХП в составе липосом. Так, инкапсулирование 1 мкг ХП в бислойную мембрану липосом сопровождалось возрастанием летальности на 40%. В то же время увеличение концентрации ХП в липосомах до 10 мкг полностью восстанавливало его протективный эффект (100% выживаемости мышей). Эти данные не находятся в противоречии с вышесказанным о целесообразности выбора для наиболее эффективной терапии минимальных химических или физических параметров лечебного фактора. В данной ситуации можно предположить, что связывание с липосомами 1 мкг ХП выводит его из «зоны эффективности», так как, по-видимому, его действие замедляется из-за депонирования. Напротив, чрезмерная концентрация ХП (10 мкг), но постепенно освобождающаяся из липосом, приобретает более благоприятный терапевтический диапазон, что следует учитывать при использовании иммунолипосом в лечебных целях.

Это нашло подтверждение при изучении протективных свойств СА. Вводимый мышам за сутки до заражения в количестве 0,0014 ЕС, эквивалентном дозе, рекомендованной для иммунизации взрослого человека (15 ЕС/70 кг массы тела) СА способствовал выживанию 80% контаминированных животных (в сравнении с 30% в контрольной группе). После включения СА в состав липосом, как и в случае с ХП, протективные свойства анатоксина снижались до 60% выживания мышей, что подтверждает предположение об экранирующе-ослабляющем эффекте липосом, содержащих биологически активное вещество. Как показало исследование, полноценным лечебно-защитным эффектом обладал комплексный препарат на липосомальной основе, содержащий терапевтическую дозу СА и повышенную дозу ХП (10 мкг), обеспечивавший 100% выживаемость мышей от стафилококкового сепсиса при условии профилактического введения полифункциональной липосомальной вакцины.

Таблица 3

Профилактическое действие препаратов ХП и СА при стафилококковой инфекции
(введение препаратов за 7 суток до контаминации)

Препарат	% выживаемости
ХП (1 мкг)	80
ХП (10 мкг)	60
ХП (100 мкг)	30
ХП (1 мкг) в составе липосом	30
ХП (10 мкг) в составе липосом	80
СА (0,0014 ЕС)	0
СА (0,0014 ЕС) в составе липосом	43
Контроль (физ. раствор)	30

Примечание: стафилококковый сепсис - 3 млрд микробных тел (суточная культура) в 1,0 мл физ. раствора в/б; исследуемые препараты ХП, СА и липосом вводились в объеме 1,0 мл за 7 суток до заражения; динамика мониторинга инфекции -10 суток.

В следующем опыте исследовали возможность изменения иммунологической реактивности организма с помощью компонентов липосом путем введения в организм профилактически - за 7 суток до заражения, так и с лечебной целью - спустя сутки после моделирования сепсиса, учитывая более высокую скорость развертывания острой инфекции у лабораторных животных по сравнению с организмом человека. Модель инфекции прежняя.

Из данных, приведенных в таблице №3 видно, что более раннее (за 7 суток) профилактическое введение ХП для оптимизации функционирования иммунной системы мышей имеет меньшее практическое значение, чем протективное действие ХП, индуцируемое за сутки перед контаминированием животных. При дозе ХП 1 мкг/мышь выживало не 100% животных, как регистрировали в предыдущем опыте, а только 80%. Последовательное увеличение дозы

ХП до 10 мкг/мышь и 100 мкг/мышь уменьшало показатель выживаемости в течение 10 суток наблюдения до 60% и 30% соответственно. Следовательно, общая закономерность ухудшения состояния резистентности организма при увеличении дозы иммуномодулятора прослеживалась и при данных условиях постановки эксперимента. Это явление и экранирующий эффект липосом в отношении протективного действия ХП также проявлялись при использовании комплекса липосом с ХП: включение ХП в концентрации 1 мкг в липосомы значительно снижало защитный эффект препарата (с 80% выживаемости до 30%), а увеличение концентрации ХП с составе липосом до 10 мкг приводило к восстановлению выживаемости до 80%. Полное отсутствие защитного действия СА при данных условиях опыта (100% летальность) и частичное протективное действие анатоксина в составе липосом (43% выживаемости) указывают на проблематичность перспектив применения данного препарата в составе поливалентной липосомальной вакцины, так как из результатов опытов следует, что отдельные компоненты этой вакцины: липосомы и ХП перекрывают протективный эффект стафилококкового анатоксина. Это вполне объяснимо, так как СА является лишь одним из многочисленных мембранных и цитоплазменных токсических субстанций данного возбудителя, несущих ответственность за патогенность стафилококков (4). Основным результатом данного исследования является подтверждение нашей концепции о более высокой эффективности использования минимально низких концентраций химических средств в лечебно-профилактических целях.

В целом, данные исследования показали принципиальную возможность управления течением стафилококковой инфекцией в эксперименте. Впервые была доказана эффективность ХП, СА, их сочетанного использования в свободной форме и особенно в составе липосомальной вакцины при сепсисе у мышей. Установлено, что наибольшей протективной эффективностью обладают не высокие, а напротив, минимальные дозы этого иммуномодулирующего пептида. Показано, что ХП и СА могут оказывать защитное действие, особенно если они применяются превентивно, за сутки до заражения. Вместе с тем обнаружено, что стимулирующее действие ХП в отношении усиления резистентности организма к инфекции является кратковременным, так как более раннее применение препарата (за 7 суток до заражения) сопровождалось менее выраженным защитным действием в отношении инфицированных мышей Использование этих препаратов, даже многократное, на фоне развившегося стафилококкового сепсиса было недостаточно эффективно, то есть механизм их действия является скорее профилактическим, а не лечебным. Включение ХП в состав липосом снижает его иммуностимулирующие свойства, что следует учитывать при синтезе липосомальной вакцины, применяя более концентрированный препарат ХП.

Данные наших исследований могут открывать перспективы использования поливалентных липосом для включения в них различных антибактериальных препаратов с последующим применением в лечебной практике (в частности, при воспалении мочевого пузыря и урогенитальных инфекциях).

Литература

1. Анджапаридзе О.Г, Торчилин В.П., Мажуль ЛА. Защитное действие виросом, содержащих антигены вируса гриппа при интраназальном способе введения. // Вопросы вирусологии 1987. Т. 32. № 1. С. 112-114.
2. Антонов В.Ф., Торчилин В.П. (ред.). Липосомы - применение в биологии и медицине. М: Наука, 1985.90 С.
3. Закревский В.И. Некоторые аспекты применения липосом в диагностике, профилактике и лечении инфекционных заболеваний. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1985. Кг 1 С. 3-9.
4. Кашкин К.П., Куликов В.И., Голованова ГА. и др. Липосомы как носители полифункциональных иммуногенов. // Украинский биохимический журнал. 1987.Т. 59. № 1. С. 100-107.
5. Куликов В.И., Кашкин К.П., Драновская Е.А. Включение протективного антигена Brucella abortus в липосомы и иммуногенные свойства антигенсодержащих липосом. // ЖМЭИ. 1985. № 12. С. 69-72.
6. Craig P.S., Zumbuebl O. Immunization against experimenthal rabbit cysticercosis using liposome-associated antigen preparation. // J. Helminthol. 1988. V 62. № 1. P. 58-62.
7. Рштдта S.U., Nain C.K., Vinayak VK. Vaccination against experimenthal hepatic, amoebic infection - an evaluation of phosphatidylcholine liposomes as immunopotentiator. // J. Parasitol. 1987 V 73. № 4. E 859-860.
8. Rhalem A. Dourdieu C, Luffau G. et al. Vccination of mice with liposome-entrapped adult antigens of Nippostrongylus brasiliensis. // Ann. Inst. Pasteur Immunol. 1988. V139. № 2. P. 157-166.
9. Snippe H., van Dam J.E.C., van Houte A.I. Preparation of a semisynthetic vaccine to streptococcus pneumoniae type 3. // Infect, and Immunol. 1983. V 42. P. 842-844.
10. Vinayak VK., Sharma R. Phosphatidylcholine liposomes as effective adjuvant for vaccination of mice against Plasmodium yoelii. // Indian J. Med. Res. 1986. V 84. P. 32-38.